

University of Groningen

Novel heart failure biomarkers

Du, Weijie

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2019

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Du, W. (2019). *Novel heart failure biomarkers: Physiological studies to understand their complexity*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Chapter 7

Summary, Discussion and Future perspectives

Summary, discussion and future perspectives

Due to the ageing population, the increase of lifestyle associated syndromes (e.g. diabetes and obesity) and better survival of patients with precipitating cardiovascular events, the number of heart failure (HF) patients is on the rise. The diagnostic strategies for HF are based on several approaches, including enquiry of medical history of the patient, a physical exam, and cardiac imaging. HF is, a very heterogeneous disorder that is also accompanied and/or affected by multiple co-morbidities, such as obesity, diabetes and hypertension, among others. The exact HF etiology is therefore difficult to extract from clinical evaluations only and for many decades, the diagnosis of HF was a garden variety of cardiac diseases with one common denominator, a decreased cardiac output. In the last decade, clinicians and researchers came to the realization that more precise categorization of HF patients will be essential for optimal HF patient management – in order to provide therapeutic granularity it will be imperative to improve on phenotyping. As it stands, HF is mainly divided in two categories according to values of left ventricular ejection fraction, which is either classified as HF with reduced ejection fraction or HF with preserved ejection fraction. It should be mentioned that the exact cut-off points for HFrEF and HFpEF have varied largely between studies, but $EF < 40\%$ is now mostly denoted as HFrEF and $EF \geq 50\%$ as HFpEF [1]. These patient groups have about equal population sizes, but whereas therapeutic treatment regimens have dramatically increased outcome for HFrEF patients, so far no proven therapy is available for patients with HFpEF. More recently, a third class was introduced with mid-range ejection fraction (HFmrEF; $40\% \leq EF \leq 49\%$), which was also incorporated in the 2016 ESC HF guidelines [2]. There are several reasons why the distinction based on LVEF is far from ideal, e.g. the symptoms, severity of neurohormonal activation, underlying etiologies, presence of co-morbidities, and response to treatment: all these crucial denominators of HF are largely independent from LVEF.

HF plasma biomarkers, in particular the natriuretic peptides (NPs) have substantially improved diagnosis HF patients. The cardiac specific plasma NPs, have been incorporated into routine clinical practice of HF patients for their incremental values in diagnostic and prognostic purposes [1, 2]. Since the levels of these cardiac specific biomarkers can be influenced by several non-cardiac diseases like sepsis, kidney disease and obesity [3-5], these biomarkers are still not ideal. Moreover, whereas the NPs indicate pathological wall stress in the heart, other plasma biomarkers may be indicative for other pathological processes, like cardiac fibrosis and inflammation. The emerging novel HF biomarkers Galectin-3 (Gal-3), Growth Differentiation Factor-15 (GDF-15) and soluble suppression of tumorigenicity 2 (sST2), amongst others, have been extensively studied in clinical trials, because they could provide additional value for prognosis and disease management.[6] Of these, Gal-3 and sST2 have been included in the

American College of Cardiology (ACC)/AHA HF guidelines as markers of myocardial fibrosis, with a class IIb recommendation, to be considered for additional risk stratification of HF patients [2, 7]. These novel HF biomarkers have been shown to represent common pathophysiological processes not only in the heart but also in other stressed or injured organs and tissues [8]. Therefore, their plasma levels can also be affected by other diseases and potential HF co-morbidities. This may explain why these purported HF biomarkers have still not found their way into daily clinical practice, in contrast to NPs. In addition to these proteins, circulating microRNAs (miRNAs) have been reported to be associated with HF severity [9-11], but, so far, none of them have been included in AHA and/or ESC guidelines. Further studies will be required to provide insight in the usefulness of these molecules as HF biomarkers.

Besides the potential role in for prognosis and HF management, these biomarkers may also constitute interesting therapeutic targets. As an example, the positive vasodilatory and cardiac unloading effects of NPs has recently resulted in the development of molecules targeting the degradation of NPs. Sacubitril, a neprilysin inhibitor prodrug, is a component of the successful HF drug, entresto, which has shown to improve HF patient outcome by limiting degradation of NPs via inhibition of neprilysin peptidase [12]. Gal-3 is another potential drug target as genetical and pharmacological inhibition of Gal-3 exhibited protective effects by reducing cardiac fibrosis and subsequent cardiac remodeling in murine HF models [13, 14]. Myeloperoxidase (MPO), a specific marker of neutrophil activation, has been shown to be elevated in blood plasma of chronic HF patients, and the increased levels were associated with HF severity [15, 16]. Genetic deletion of MPO in mice protected against cardiac remodeling post-MI and suppressed atrial fibrosis in AngII infused mice, suggesting that MPO could be an attractive therapeutic target for cardiac diseases [17-20]. Additionally, several miRNAs have been shown to be implicated in cardiac diseases [21]. Circulating miR-328 levels were significantly upregulated in myocardial infarction (MI) and atrial fibrillation and transgenic overexpression of miR-328 contributed to fibrosis associated adverse cardiac electrical remodeling [22-24]. Whether miR-328 is involved in the regulation of cardiac fibrotic responses upon MI remains unknown.

The aim of this thesis (**chapter 1**) was to investigate the potential of therapeutic targeting of certain HF biomarkers and to investigate the cardiac and non-cardiac contribution of HF biomarkers in cardiac disease by using mouse and rat HF models.

In **chapter 2**, we review current clinical and experimental studies regarding the diagnostic and prognostic role of the most relevant and potential new HF biomarkers. We address deficiencies in current biomarker studies and discuss the non-cardiac specific nature of most of these novel

HF biomarkers. These novel HF biomarkers are associated with specific processes, like fibrosis and inflammation, and hence could provide us with information on the fibrotic or inflammatory state of the heart. These are, however, generic processes which can also be activated in other organs and tissues upon stress or injury, and hence plasma levels do not necessarily reflect the cardiac status. Since HF is a systemic disease and is also associated with multiple co-morbidities this may hamper the interpretation of elevated plasma biomarker levels. Therefore, it is still unclear whether altered plasma biomarker levels represent solely cardiac production and can be directly associated with the degree of cardiac remodeling. Clinical association studies will not provide sufficient information to solve these issues, because cardiac samples are often not available and full body biomarker profiling will not be realistic or may be impossible. We finally address some of the common issues and propose to investigate these elusive biomarkers more comprehensively in HF animal models.

In **chapter 3**, we studied the role of miR-328 in cardiac fibrosis and the underlying mechanisms. In patients with atrial fibrillation and after myocardial infarction circulating levels of miR-328 have been shown to be strongly elevated. Here we showed that in mice miR-328 expression was strongly upregulated in the border zone of the infarcted myocardium. Expression of pro-fibrotic TGF- β 1 was concomitantly, increased whereas anti-fibrotic TGF- β RIII was decreased in the infarcted myocardium. In vitro, miR-328 transfection of primary mouse cardiac fibroblasts resulted in enhanced collagen production via due to miR-328 mediated TGF- β RIII downregulation. Importantly, application of specific miR-328 antisense by an antagomir remarkably reduced collagen content and cardiac fibrosis in *in vivo* and *in vitro* studies. Thus, we identified a novel pathway in which miR-328 directly targeted and reduced TGF- β RIII levels, which in turn stimulated TGF- β 1 mediated cardiac fibrosis. These effects were abrogated by specific antagomir of miR-328. MiR-328 may therefore represent a promising therapeutic target for treatment of cardiac fibrotic diseases in ischemic heart disease. Since circulating miR-328 levels are decreased in HF (in contrast to MI), the situation in HF may be more complicated and this requires further investigation.

In **chapter 4**, we conduct a pharmacological study to investigate whether a novel myeloperoxidase (MPO) inhibitor, AZM198, could prevent cardiac adverse remodeling in an *in vivo* mouse model of pressure overload (TAC) after 4 and 8 weeks. We found that treatment with this MPO inhibitor temporally delayed cardiac hypertrophy and preserved cardiac function at 4 weeks. This inhibitor, however, failed to halt deterioration of cardiac remodeling and no differences could be observed anymore at 8 weeks post-TAC. Although previous studies showed that genetic inhibition of MPO could suppress fibrotic responses in MI [19] and AngII treated mice [20]. We did not observe anti-fibrotic effects with this inhibitor in our

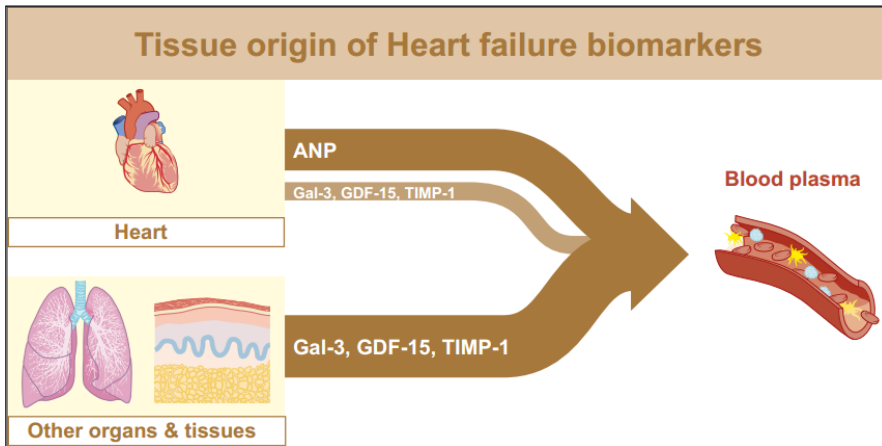


Figure 1. Tissue origin of heart failure biomarkers. Schematic depiction of organ/tissue to blood plasma biomarkers levels. Included organs/tissues: heart, lungs, kidney, liver, and visceral adipose tissue (VAT).

mouse model. Importantly, MPO plasma levels were not increased in these mice, despite strongly reduced cardiac function, challenging its potential function as a cardiac biomarker and target.

In **chapter 5**, we describe an elaborate mouse plasma biomarker study involving three different mouse HF models. In particular, we included two models of HFrEF, namely a transverse aortic constriction (TAC) and a myocardial infarction (MI) model and one model with HFpEF characteristics generated by a high fat diet (HFD) and angiotensin II (AngII) infusion (obesity/hypertension). We subsequently investigated HF biomarkers Atrial natriuretic peptide (ANP), Gal-3, GDF-15 and TIMP-1 at three different levels: i) organ gene expression, ii) organ protein quantities and iii) plasma protein levels, all in relation to cardiac function and structure. Surprisingly, in contrast to the established HF biomarker ANP, plasma levels of the purported HF biomarkers (Gal-3, GDF-15, TIMP-1) did not show a direct association with cardiac function. All biomarkers were elevated in cardiac tissue in these diseased hearts and this paralleled in most cases cardiac protein levels, but this did not affect plasma pools. The increased circulating levels of GDF-15 and TIMP1 correlated with lung weight after TAC, suggesting that TAC mediated congestion may be responsible for their increased plasma levels. In contrast, high fat diet strongly elevated plasma levels of these biomarkers, most likely as a result of elevated production in adipose tissue. Our study suggested that rather than being specific for indices of cardiac remodeling, these biomarkers reflect health status beyond cardiac function. They also reflect stress in other organs, either as a consequence of the failing heart and/or as a consequence of other underlying comorbidities, like the metabolic syndrome (Figure 1).

In **chapter 6**, we extend these observations by investigating cardiac expression and plasma levels of these biomarkers in a transgenic rat model with hypertension (Ren2). Ren2 rats showed reduced ejection fraction and impaired hemodynamic parameters. Cardiac hypertrophy and dilatation were observed in these rats, but also other organs showed an increased weight in these systemic hypertensive rats. Expression of all investigated biomarkers was elevated in the heart, but importantly also in the kidney. ANP, GDF-15 and TIMP1 plasma levels were all elevated in Ren2 rats, and in the case of ANP this could only be cardiac derived. However, the elevated plasma levels of the other biomarkers could not be solely linked to the heart and elevated kidney expression could also have a significant contribution. This clearly displays, how difficult it will be to link the plasma levels to specific indices of cardiac function or remodeling, as other tissues will obscure plasma levels in this complex syndrome. Unfortunately, we were not able to determine rat Gal-3 plasma levels, as a result of inappropriate reagents, an issue which was also discussed in Chapter 2 and which hampers biomarker research in animal models.

In summary, we provided mechanistic insights of miR-328 in promoting cardiac fibrosis and the potentials as a therapeutic target for treatment of cardiac fibrotic disease by a specific antagomir. MPO inhibition, only temporally delayed but did not inhibit cardiac remodeling upon pressure overload indicating that under this condition it does not play a substantial role in cardiac remodeling. This is in agreement with a lack of elevation of MPO levels post-TAC, which is opposite to what has been found in post-MI mouse studies. Thus, the role of MPO in cardiac remodeling may be dependent on the etiology and this requires further investigation. Our comprehensive HF animal models in mouse and in rat revealed that only ANP plasma levels can indicate specific indices for cardiac remodeling, but other alleged novel biomarkers may also reflect stress in other organs, either as a consequence of the failing heart and/or as a consequence of other underlying comorbidities.

Future perspectives

Heart failure is a heterogeneous complex syndrome and further patient stratification allowing patient tailored therapy is an important goal. We are at the brink of personalized medicine, but at current, we lack tools for proper pathophysiological stratification and to provide patients with personalized treatment. Although sub-division based on LVEF has some merits, it will on its own not be sufficient to adequately categorize the heterogeneous HF population. Moreover, we also need to understand the underlying biology, in order to generate “personalized” therapy for HF patients and in particular to identify treatment opportunities for HFpEF patients. Plasma biomarkers may have the potential to allow further stratification and may themselves be potential targets for tailored therapy.

Our animal studies do, however, show that this will require further exploration. Specifically, the multi-organ expression of these biomarkers prevents to directly link plasma levels to one organ or tissue, and the heart in particular. Nevertheless, our studies also showed that not all biomarkers are equally expressed in all organs and are also not equally affected by stress in different organs. Therefore, we would need a topological and spatiotemporal human organ/tissue map with expression (and specific plasma contributions derived from these local productions) of a large number of plasma biomarkers in relation to specific stress conditions. With that in hand we could generate a biomarker profile that allows us to extract more specific information about pathological processes in specific organs. A recent study has demonstrated that a multi-biomarker panel together with unsupervised cluster analysis may identify distinct endotypes with apparent different outcomes and response to therapy [25]. A better understanding of organ plasma biomarker contribution under different disease states will be extremely helpful in the interpretation of such complex multi-biomarker panels and may also provide a more rational analysis and explanation regarding the underlying biology. Although this will be a daunting task, it is most likely the only way forward in biomarker research and without doubt such a map will be very valuable and not only for cardiac disease.

References

1. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE, Jr., Drazner MH, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines. *Circulation*. 2013; 128: 1810-52.
2. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European heart journal*. 2016; 37: 2129-200.
3. Takase H, Dohi Y. Kidney function crucially affects B-type natriuretic peptide (BNP), N-terminal proBNP and their relationship. *European journal of clinical investigation*. 2014; 44: 303-8.
4. Clerico A, Giannoni A, Vittorini S, Emdin M. The paradox of low BNP levels in obesity. *Heart failure reviews*. 2012; 17: 81-96.
5. Brueckmann M, Huhle G, Lang S, Haase KK, Bertsch T, Weiss C, et al. Prognostic value of plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide in patients with severe sepsis. *Circulation*. 2005; 112: 527-34.
6. de Boer RA, Daniels LB, Maisel AS, Januzzi JL, Jr. State of the Art: Newer biomarkers in heart failure. *European journal of heart failure*. 2015; 17: 559-69.
7. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE, Jr., Colvin MM, et al. 2017 ACC/AHA/HFSA Focused Update of the 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of Heart Failure: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines and the Heart Failure Society of America. *Journal of cardiac failure*. 2017; 23: 628-51.
8. Piek A, Du W, de Boer RA, Sillje HHW. Novel heart failure biomarkers: why do we fail to exploit their potential? *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 2018; 55: 246-63.
9. Bruno N, ter Maaten JM, Ovchinnikova ES, Vegter EL, Valente MA, van der Meer P, et al. MicroRNAs relate to early worsening of renal function in patients with acute heart failure. *International journal of cardiology*. 2016; 203: 564-9.
10. Vegter EL, Schmitter D, Hagemeyer Y, Ovchinnikova ES, van der Harst P, Teerlink JR, et al. Use of biomarkers to establish potential role and function of circulating microRNAs in acute heart failure. *International journal of cardiology*. 2016; 224: 231-9.
11. Ovchinnikova ES, Schmitter D, Vegter EL, Ter Maaten JM, Valente MA, Liu LC, et al. Signature of circulating microRNAs in patients with acute heart failure. *European journal of heart failure*. 2016; 18: 414-23.
12. Voors AA, Dorhout B, van der Meer P. The potential role of valsartan + AHU377 (LCZ696) in the treatment of heart failure. *Expert opinion on investigational drugs*. 2013; 22: 1041-7.
13. Liu YH, D'Ambrosio M, Liao TD, Peng H, Rhaleb NE, Sharma U, et al. N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline prevents cardiac remodeling and dysfunction induced by galectin-3, a mammalian adhesion/growth-regulatory lectin. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2009; 296: H404-12.
14. Yu L, Ruifrok WP, Meissner M, Bos EM, van Goor H, Sanjabi B, et al. Genetic and pharmacological inhibition of galectin-3 prevents cardiac remodeling by interfering with myocardial fibrogenesis. *Circulation Heart failure*. 2013; 6: 107-17.
15. Mocatta TJ, Pilbrow AP, Cameron VA, Senthilmohan R, Frampton CM, Richards AM, et al. Plasma concentrations of myeloperoxidase predict mortality after myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007; 49: 1993-2000.

16. Tang WH, Brennan ML, Philip K, Tong W, Mann S, Van Lente F, et al. Plasma myeloperoxidase levels in patients with chronic heart failure. *The American journal of cardiology*. 2006; 98: 796-9.
17. 1
18. Vasilyev N, Williams T, Brennan ML, Unzek S, Zhou X, Heinecke JW, et al. Myeloperoxidase-generated oxidants modulate left ventricular remodeling but not infarct size after myocardial infarction. *Circulation*. 2005; 112: 2812-20.
19. Mollenhauer M, Friedrichs K, Lange M, Gesenberg J, Remane L, Kerkenpass C, et al. Myeloperoxidase Mediates Postischemic Arrhythmogenic Ventricular Remodeling. *Circulation research*. 2017; 121: 56-70.
20. Rudolph V, Andrie RP, Rudolph TK, Friedrichs K, Klinke A, Hirsch-Hoffmann B, et al. Myeloperoxidase acts as a profibrotic mediator of atrial fibrillation. *Nature medicine*. 2010; 16: 470-4.
21. Barwari T, Joshi A, Mayr M. MicroRNAs in Cardiovascular Disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 2016; 68: 2577-84.
22. Lu Y, Zhang Y, Wang N, Pan Z, Gao X, Zhang F, et al. MicroRNA-328 contributes to adverse electrical remodeling in atrial fibrillation. *Circulation*. 2010; 122: 2378-87.
23. da Silva AMG, de Araujo JNG, de Oliveira KM, Novaes AEM, Lopes MB, de Sousa JCV, et al. Circulating miRNAs in acute new-onset atrial fibrillation and their target mRNA network. *Journal of cardiovascular electrophysiology*. 2018; 29: 1159-66.
24. He F, Lv P, Zhao X, Wang X, Ma X, Meng W, et al. Predictive value of circulating miR-328 and miR-134 for acute myocardial infarction. *Molecular and cellular biochemistry*. 2014; 394: 137-44.
25. Tromp J, Ouwerkerk W, Demissei B.G, Anker S.D, Cleland J.G, Dickstein K, Filippatos G, van der Harst P, Hillege H.L, Lang C.C, Metra M, Ng L.L, Ponikowski P, Samani N.J, van Veldhuisen D.J, Zannad F, Zwinderman A.H, Voors A.A, and van der Meer P. (2018) *European Heart Journal*, (Accepted for Publication)

Samenvatting, discussie en toekomstperspectieven

Door de verouderende populatie, de toename van de prevalentie van met levensstijl geassocieerde aandoeningen (diabetes en obesitas) en steeds betere overleving van patiënten met een cardiovasculaire voorgeschiedenis neemt het aantal patiënten met hartfalen toe. Het diagnosticeren van hartfalen is voornamelijk gebaseerd op de medische voorgeschiedenis van de patiënt, het lichamelijk onderzoek, en cardiale beeldvormingstechnieken. Hartfalen is een zeer heterogene aandoening die vaak samengaat met en/of beïnvloed wordt door co-morbiditeiten zoals obesitas, diabetes en hypertensie. Het is moeilijk om alleen op basis van een klinische evaluatie van een patiënt met hartfalen de exacte etiologie en pathologie van het ziektebeeld vast te stellen. Decennia lang bestond de diagnose van hartfalen daarom uit een variëteit van cardiovasculaire aandoeningen met één gemeenschappelijke factor: een verlaagde cardiale output. In de afgelopen jaren zijn klinici en onderzoekers zich gaan realiseren dat een meer specifieke indeling van patiënten met hartfalen noodzakelijk is voor optimale behandeling en om patiëntspecifieke therapie mogelijk te maken. Om dit doel te bereiken zal het noodzakelijk zijn de fenotypering van de patiënt te verbeteren. Op dit moment wordt hartfalen voornamelijk ingedeeld in twee categorieën. Aan de hand van de ejectiefractie (EF) van de linker kamer wordt een onderscheid gemaakt tussen hartfalen met verlaagde (reduced) ejectiefractie (HFrEF) en behouden (preserved) ejectiefractie (HFpEF). Het is belangrijk hierbij te noemen dat er aanzienlijke variatie is geweest in de grenswaarde voor HFrEF en HFpEF in verschillende klinische studies, maar momenteel wordt een EF <40% meestal geclassificeerd als HFrEF en een EF >50% als HFpEF [1]. Deze twee patiëntengroepen hebben ongeveer eenzelfde groepsgrootte, maar waar met behulp van behandelingen de situatie van HFrEF-patiënten aanzienlijk hebben verbeterd is er tot nu toe geen bewezen behandelingsmethode voor patiënten met HFpEF. Recentelijk is er een derde klasse toegevoegd gekenmerkt door een gemiddelde (mid-range) ejectiefractie (HFmrEF; 40%<EF<50%) en deze klasse is, net zoals HFrEF en HFpEF, opgenomen in de hartfalenrichtlijn van de Europese Society of Cardiology (ESC) van 2016 [2]. Veel cruciale bepalende factoren van hartfalen, zoals de symptomen, mate van neurohormonale activatie, onderliggende etiologie, aanwezigheid van co-morbiditeiten, en behandelingseffecten, zijn voor een groot deel onafhankelijk van de EF van de linker kamer. De indeling op alleen EF is dan ook verre van ideaal en betere patiëntstratificatie is daarom zeer gewenst.

Biomarkers van hartfalen aanwezig in bloedplasma, met name de natriuretische peptiden (NPs), hebben substantieel bijgedragen aan de verbetering van het stellen van de diagnose hartfalen. Aangezien deze hartspecifieke plasma NPs de diagnostische en prognostische voorspellingen ten aanzien van hartfalen sterk hebben verbeterd, is het gebruik van deze markers nu standaard

in de diagnostiek en behandeling van hartfalenpatiënten [1, 2]. Omdat de niveaus van deze biomarkers in het bloed worden beïnvloed door meerdere niet-cardiale aandoeningen, zoals sepsis, nierziekte en obesitas, zijn deze biomarkers nog steeds niet ideaal [3-5]. Daarnaast geven deze biomarkers slechts een indicatie van pathologische wandstress in het hart, maar worden andere pathologische processen verantwoordelijk voor het ontstaan van hartfalen niet weerspiegeld in de niveaus van deze markers. Biomarkers die pathologische processen zoals fibrose (verbindweefseling) en ontsteking in het hart kunnen representeren, zouden extra inzicht kunnen verschaffen over het zieke hart. Verschillende nieuwe biomarkers van hartfalen, waaronder Galectin-3 (Gal-3), Growth Differentiation Factor-15 (GDF-15) en soluble Suppression of Tumorigenicity 2 (sST2), zijn uitgebreid onderzocht in klinische studies omdat ze toegevoegde prognostische waarde zouden kunnen hebben en kunnen bijdragen aan de behandeling van hartfalen [6]. Van deze drie zijn Gal-3 en sST2 ook genoemd in de HF-richtlijnen van de American College of Cardiology / American Heart Association (ACC/AHA) als mogelijke markers van myocardiale fibrose, met een klasse IIb aanbeveling, en kunnen overwogen worden voor extra risicostratificatie van patiënten met hartfalen [2, 7]. Deze nieuwe biomarkers van hartfalen geven algemene pathologische processen weer (fibrose) die niet alleen in het hart voorkomen, maar ook in andere beschadigde organen of weefsels die stress ondervinden [8]. De plasmaniveaus van deze biomarkers kunnen daardoor ook door andere ziektes en aandoeningen, en dus ook door co-morbiditeiten van hartfalen worden beïnvloed. Dit kan verklaren waarom deze veronderstelde biomarkers van hartfalen nog steeds geen plaats hebben gekregen in de dagelijkse klinische praktijk, in tegenstelling tot de NPs. Naast eiwitten zijn er ook circulerende microRNAs (miRNAs) gevonden die geassocieerd zijn met de ernst van hartfalen [9-11], maar tot nu toe zijn geen van deze miRNAs toegevoegd aan de richtlijnen van de ACC/AHA en/of de ESC. Verder onderzoek zal noodzakelijk zijn om inzicht te geven in de bruikbaarheid van deze moleculen als biomarkers van hartfalen.

Naast de mogelijke rol voor de prognose en behandelingsmogelijkheden, kunnen biomarkers ook interessante therapeutische targets zijn. De positieve vasodilatatie-effecten van NPs hebben bijvoorbeeld geleid tot de ontwikkeling van medicijnen die de afbraak van NPs tegen gaan. Sacubitril, een neprilysin-inhibitor pro-drug, is een onderdeel van het succesvolle hartfalenmedicijn Entresto, die de uitkomst van patiënten met hartfalen verbetert door de afbraak van NPs tegen te gaan [12]. Genetische en farmacologische inhibitie van Gal-3 resulteert in verminderde fibrose en zogenaamde remodeling van het hart in muismodellen van hartfalen en is daarom een ander voorbeeld van een mogelijk aangrijpingspunt voor nieuwe medicamenten [13, 14]. Myeloperoxidase (MPO), een specifieke marker van activatie van neutrofielen, is verhoogd in bloedplasma van patiënten met chronisch hartfalen en de

verhoogde niveaus zijn gecorreleerd aan de ernst van hartfalen [15, 16]. Genetische deletie van MPO in muizen is beschermend tegen cardiale remodeling na een myocardinfarct en verminderde tevens fibrose in de hartboezems in muizen die angiotensine-II kregen toegediend. Dit suggereert dat MPO-inhibitie mogelijk interessante mogelijkheden biedt als nieuwe therapeutische interventie van hartspierziektes [17-20]. Daarnaast zouden miRNAs die geassocieerd zijn met hartspierziektes als mogelijke targets kunnen worden gezien [21]. De niveaus van circulerend miR-328 zijn significant verhoogd na een myocardinfarct en bij boezemfibrilleren en transgene overexpressie van miR-328 in muizen veroorzaakt fibrose-geassocieerde geleidingsstoornissen in het hart [22-24]. Of miR-328 direct betrokken is bij de regulatie van cardiale fibrose na een myocardinfarct is tot nu toe onbekend.

Het doel van dit proefschrift (**hoofdstuk 1**) was tweeledig, namelijk onderzoeken of bepaalde biomarkers van hartfalen als mogelijke therapeutische targets konden dienen en om de cardiale en niet-cardiale contributie van biomarkers van hartfalen te onderzoeken in muis- en ratmodellen van hartfalen.

In **hoofdstuk 2**, bespreken we de huidige klinische en experimentele studies die betrekking hebben op de diagnostische en prognostische rol van de potentieel meest relevante biomarkers van hartfalen. We adresseren deficiënties in huidige biomarkerstudies en bediscussiëren de niet-cardiale origine van de meeste nieuwe biomarkers van hartfalen. Deze nieuwe biomarkers zijn geassocieerd met specifieke processen, zoals fibrose en ontsteking, en kunnen daarom, in theorie, informatie geven over de mate van fibrose en ontsteking in het hart. Dit zijn echter algemene processen die ook geactiveerd kunnen worden in andere beschadigde organen of weefsels die stress ondervinden en de niveaus in het plasma zijn daarom niet noodzakelijkerwijs een directe reflectie van de status van deze processen in het hart. Omdat hartfalen een systemische ziekte is en ook geassocieerd is met vele co-morbiditeiten kan dit de interpretatie van verhoogde niveaus van biomarkers in het plasma verder bemoeilijken. Het is daarom nog steeds onduidelijk of veranderingen in niveaus van biomarkers in het plasma de cardiale productie correct weergeven en geassocieerd zijn met de ernst van hartfalen. Klinische associatiestudies zullen deze vraagstukken niet gaan beantwoorden, omdat hartbiopten meestal niet beschikbaar zijn en het genereren van volledige biomarkerprofielen in weefsels van de mens waarschijnlijk niet realistisch is. We stellen in dit overzichtsartikel daarom voor om deze leemtes in onze kennis aan te vullen door middel van uitgebreide weefselsanalyse van biomarkers in diersmodellen van hartfalen

In **hoofdstuk 3**, hebben we de rol van miR-328 in cardiale fibrose bestudeerd en de onderliggende processen blootgelegd. In patiënten met boezemfibrilleren of met een

myocardinfarct zijn de circulerende miR-328 niveaus sterk verhoogd. We laten hier zien dat in muizen miR-328 expressie sterk verhoogd is in de borderzone van het myocardinfarct. Dit ging gepaard met de expressie van het pro-fibrotisch eiwit TGF- β 1, terwijl de anti-fibrotische TGF- β RIII receptorexpressie verlaagd was. Transfectie van primaire cardiale muisfibroblasten *in vitro* resulteerde in verhoogde collageenproductie als gevolg van miR-328-gemedieerde TGF- β RIII suppressie. Toedienen van specifiek miR-328 antisense in de vorm van een antagomir resulteerde in een opzienbarende verlaging van de hoeveelheid collageen en cardiale fibrose in *in vivo* en *in vitro* muismodellen. We hebben daarom een nieuwe signaaltransductieroute geïdentificeerd, waarin miR-328 op een directe wijze TGF- β RIII-niveaus reduceert en daardoor TGF- β 1-gemedieerde cardiale fibrose stimuleert. Deze effecten werden voorkomen door specifieke antagomirs tegen miR-328. MiR-328 kan daarom een interessant target zijn voor de behandeling van fibrotische cardiale aandoeningen in ischemisch hartziekten. Omdat circulerende miR-328-niveaus verlaagd zijn bij hartfalen (in tegenstelling tot myocardinfarct), zal de situatie in hartfalen gecompliceerder zijn en dit vereist verder onderzoek.

In **hoofdstuk 4**, hebben we een farmacologische studie beschreven waarin we onderzocht hebben of een nieuwe inhibitor van myeloperoxidase (MPO), AZM198, pathologische cardiale remodeling kon voorkomen in een *in vivo* muis model gecreëerd door 4 en 8 weken cardiale drukoverbelasting (zogenaamd TAC model). In dit model bleek dat behandeling met deze MPO-inhibitor een vertraging gaf in het ontwikkelen van cardiale hypertrofie met tijdelijk behoud van hartfunctie. Deze inhibitor was echter niet in staat om cardiale remodeling te stoppen en na 8 weken konden er geen verschillen meer worden gezien in cardiale remodeling en hartfunctie tussen de behandelde en onbehandelde groepen. Eerdere studies hebben laten zien dat genetische deletie van MPO in muizen cardiale fibrose na een myocardinfarct [19] en na infusie van angiotensine-II [20] kon verminderen in deze muizen. We hebben geen anti-fibrotische effecten waargenomen met deze inhibitor in ons muismodel. Het is van belang om op te merken dat plasmaniveaus van MPO ook niet waren verhoogd in muizen met cardiale drukbelasting, ondanks sterk verminderde hartfunctie. De bruikbaarheid van MPO als biomarker van hartfalen en als target voor medicamenten moet daarom eerst nog verder worden vastgesteld en zou afhankelijk kunnen zijn van de etiologie van hartfalen.

In **hoofdstuk 5**, beschrijven we een uitgebreide studie van biomarkers in het plasma van muizen uit drie verschillende modellen van hartfalen. Dit betreft twee HFrEF-modellen, namelijk een transverse aorta constrictie (TAC) en een myocardinfarct (MI) model en één model met karakteristieken van HFpEF, geïnduceerd door een hoog vet dieet (HFD) en Angiotensine-II (AngII) infusie (obesitas/hypertensie). We hebben vervolgens de biomarkers van hartfalen Atrial natriuretisch peptide (ANP), Gal-3, GDF-15 en TIMP-1 op drie

verschillende niveaus onderzocht, te weten: i) genexpressie in organen, ii) eiwitgehalten in organen en iii) eiwitniveaus in het plasma. Dit is tevens onderzocht in relatie met hartfunctie en mate van remodeling in het hart. In tegenstelling tot de bewezen biomarker van hartfalen ANP waren de plasmalevels van Gal-3, GDF-15, TIMP-1 verrassenderwijs niet geassocieerd met hartfunctie. Genexpressie van alle biomarkers was verhoogd in de aangedane harten en dit resulteerde in de meeste gevallen in verhoogde eiwitniveaus, maar dit had geen effect op de plasmalevels. De verhoogde plasmalevels van GDF15 en TIMP1 correleerden met longgewicht na TAC en dit suggereert dat TAC-geïnduceerde longcongestie mede verantwoordelijk was voor deze verhoogde plasmaniveaus. Hoog vet dieet gaf daarentegen een sterke verhoging in plasmaniveaus van deze biomarkers (Gal-3, GDF-15 en TIMP-1), wat hoogstwaarschijnlijk een gevolg is van de sterk verhoogde productie in vetweefsel. Deze studie impliceert dat deze biomarkers niet specifiek zijn voor indices van remodeling van het hart, maar een meer algemeen inzicht geven in de gezondheid van de patiënt. Deze markers zijn ook een maat voor stress in andere organen en dit kan zowel een consequentie zijn van hartfalen, maar ook een indirect gevolg zijn van andere co-morbiditeiten, zoals het metabool syndroom (Figuur 1).

In **hoofdstuk 6** hebben we onze observaties verder uitgebreid door cardiale expressie en plasmaniveaus van bovenstaande biomarkers in een transgeen ratmodel (Ren2) met hypertensie te onderzoeken. Ren2 ratten ontwikkelden hartfalen met een verlaagde EF en een sterk verslechterde hemodynamiek. Cardiale hypertrofie en dilatatie waren zichtbaar in deze ratten, maar ook andere organen waren aangedaan, zoals bleek door verhoogde orgaangewichten in deze hypertensieve ratten. Expressie van alle onderzochte biomarkers was verhoogd in de harten, maar niet minder belangrijk ook in de nieren. ANP, GDF-15 and TIMP1 plasmaniveaus waren allen verhoogd in Ren2 ratten en in het geval van ANP kon dit alleen aan de productie in het hart worden toegeschreven. De plasmaniveaus van de andere biomarkers konden echter niet specifiek aan het hart worden toegeschreven en verhoogde nierexpressie zou ook een significante bijdrage aan de verhoogde plasmaniveaus kunnen geven. Dit laat duidelijk zien hoe moeilijk het is om niveaus van biomarkers in het plasma specifiek toe te dichten aan indices van hartfunctie of remodeling, omdat andere weefsels de plasmaniveaus dynamisch kunnen “vervuilen” in dit complexe syndroom. Helaas, waren we niet in staat Gal-3 plasmaniveaus in ratten te bepalen door een gebrek aan geverifieerde reagentia, een probleem dat ook al in hoofdstuk 2 ter sprake kwam en het onderzoeken van biomarkers in dierstudies bemoeilijkt.

Samenvattend hebben we inzicht gegeven in de mechanismen van miR-328 gemedieerde hartfibrose en de mogelijkheid om antagomirs te gebruiken als mogelijk middel tegen cardiale fibrose. MPO-inhibitie liet slechts tijdelijke vertraging zien in het ontstaan van cardiale remodeling na drukbelasting van het hart, wat aantoont dat MPO geen essentiële factor is in

remodeling van het hart onder deze condities. Dit is in overeenstemming met de afwezigheid van verhoogde MPO-niveaus na TAC-inductie, wat daarom afwijkt in andere beschreven muismodellen van hartfalen. De rol van MPO in cardiale remodeling zou dus afhankelijk kunnen zijn van de etiologie van hartfalen en dit maakt verder onderzoek noodzakelijk. Onze uitgebreide dierstudies in muis- en ratmodellen van hartfalen lieten uiteindelijk zien dat alleen plasmaniveaus van ANP specifiek zijn voor indices van hartfunctie, en dat andere biomarkers ook stress in andere organen en weefsels weergeven.

Toekomstperspectieven.

Hartfalen is een heterogeen en complex syndroom en een verbetering van patiëntstratificatie kan wellicht helpen in patiëntspecifieke behandeling en verbeterde management van hartfalen. We zijn nu beland in een tijdperk waarbij “personalized medicine” een steeds belangrijkere rol gaat spelen, maar op dit moment missen we nog de instrumenten voor goede pathofysiologische stratificatie van de verschillende patiëntpopulaties die worden geschaard onder het ziektebeeld hartfalen. Alhoewel onderverdeling op basis van EF enige houvast geeft, is dit op zichzelf onvoldoende om tot een adequate indeling te komen van deze heterogene patiëntengroep. Bovendien moeten we ook de onderliggende biologie begrijpen om uiteindelijk patiëntspecifieke therapieën te kunnen ontwikkelen. Dit is met name belangrijk voor de patiënten met HFpEF waarvoor nog steeds geen bewezen behandelingsmethode bestaat. Biomarkers in plasma hebben de potentie om verdere stratificatie mogelijk te maken en zouden zelf ook potentiële targets kunnen zijn voor patiëntspecifieke therapie. Onze dierstudies laten echter zien dat dit gecompliceerder is dan gedacht en dat hiervoor verder onderzoek nodig is. Met name de expressie van biomarkers in meerdere organen bemoeilijkt het maken van directe associaties tussen verhoogde plasmaniveaus en schade of stress in een specifiek orgaan, zoals het hart. Desalniettemin, laat onze studie ook zien dat expressie van biomarkers in organen verschillend is en dat expressie niet gelijkelijk verandert in al deze organen onder stresscondities. Daarom zou het hebben van een topologische en tijdsafhankelijk overzicht van de humane orgaan- en weefselexpressie van deze biomarkers aanwezig in bloedplasma in relatie tot specifieke stresscondities een zeer behulpzaam instrument kunnen zijn. Met een dergelijk overzicht in de hand zouden er biomarkerprofielen kunnen worden opgesteld die ons in staat stellen om specifieke informatie over pathologische processen in specifieke organen te kunnen vaststellen. Een recente studie heeft laten zien dat een dergelijk multi-biomarkerpanel tezamen met unsupervised cluster analyse verschillende endotypes kan identificeren met verschillende uitkomst en verschillende reactie op behandeling [25]. Een beter inzicht in de bijdrage van verschillende organen aan de niveaus van biomarkers in plasma in verschillende ziektecondities zou zeer waardevol kunnen zijn in de interpretatie van zulke complexe multi-

biomarkerpanels en kan ook een rationele geven voor deze analyse en de onderliggende biologische processen duiden. Het betreft hier een omvangrijke taak, maar dit is een weg die bewandeld zal moeten worden om verdere voortgang binnen het biomarkeronderzoek te bewerkstelligen, en zonder twijfel zal een dergelijk overzicht niet alleen voor cardiologie, maar ook voor tal van andere specialismen, waardevol zijn.

ACKNOWLEDGEMENTS

The successful completion of my thesis would not have been made possible without help, support, encourage and friendship of many people whom I wish to acknowledge below.

My sincere thanks and utmost appreciation to my promotor, Prof. dr. Rudolf de Boer. Dear Rudolf, I want to thank you for giving me the opportunity to pursue my PhD in the Netherlands. Your enthusiasm, humor, self-confidence and your optimistic attitude positively influenced me. I am truly gratefully for your support. Thank you for pushing me on projects occasionally.

I also would like to thank my co-promotor, Dr. Herman Silljé. Dear Herman, I have greatly benefit from your knowledge and experience, which I learned a lot from you. You are a very nice supervisor. Thank you for always keeping a door open, and help me solve almost any questions. Thank you for your patience. You always encourage me when I frustrated because of bad results. Thanks for your tremendous help in teaching me how to prepare a presentation well. I learned much from your creative scientific thoughts. I appreciate your invaluable suggestions and hands on experience, and revisions and comments on my thesis preparation.

I would like to thank Prof. dr. Wiek van Gilst. Dear Wiek, you provided me the opportunity to join the Experimental Cardiology Laboratory and pursue my thesis research in Groningen. You have always been kind. I still remember you encouraged me after my first presentation at the lunch meeting.

To the members of my reading committee, Prof. dr. A.A. Voors, Prof. dr. P. Heeringa and Prof. dr. B. Schroen, thank you for your kind and efficient evaluation of my thesis.

I would like to thank Prof. dr. Pim van der Harst, Dr. Beatrjs Bartelds, Dr. Peter van der Meer, Dr. Alexander Maass, and Dr. Daan Westenbrink for your valuable comments and suggestions for my projects at the PhD and lunch meetings.

I would like to express my appreciation to my colleagues who helped me so much during these years. I would not manage it without you help. Dear Carla Hooijschuur and Danielle Groenhagen, thank you for providing me administrative assistance. Dear Janny Takens, Ingeborg Vreeswijk-Baudoin, Silke Oberdorf-Maass, Oberdorf-Maass, Martin Dokter, Reinier Bron, Marloes Schouten, Bibiche Boersma and Theo van Poele, thank you for teaching me experimental skills, sharing your expertise, and helping me

with experiments. I am very grateful to Silke for helping me with Western blots, Martin for helping me with histology, Theo for processing tissues and Reinier for helping me with qPCR. Dear Inge, we worked together in the CDL for almost one and a half year, your surgical skills on small animal models are perfect, thank you for your hard work. Dear Cees W.A. van de Kolk, thank you for helping with MRI experiments.

I would like to thank all the post docs, PhDs and students. A very big thank to Arnold Piek (thanks for helping me finish MPO and heart failure biomarkers studies, and also thanks for correcting my dutch summary), to Atze van der Pol and Lysanne Jorna (we were roomies for many years, I wish you all the best), Martijn Hoes (you are very kind and thank you for sharing the Chinese beer), to Wardit Tigchelaar and Anne-Margreet de Jong, (thanks for helping me with experiments when I came to the lab). To Wouter te Rijdt (you can speak some Chinese and maybe you will learn more), Laura Meems, Wouter Meijers, Sophie Meyer, Hanna Pragt, to Lawien Al Ali, Nils Bömer, Harmen Booi, Megan Cannon, Ruben Eppinga, Hilde Groot, Niels Grote Beverborg, Minke Hartman, Johanneke Hartog, Vincent Haver, Edgar Hoorntje (Our football team), to Navin Suthahar (I enjoyed our conversations), to Jasper Tromp, Mathilde Vermeer, Rogier van der Velde (you looks very gentle and kind), to Salva Reverentia Yurista (Thank you for helping me with powdering the tissues), Anne-Marie Koop (we had nice conversations), Niek Verweij, Haye van der Wal, Louise van Wijk, Guido Bossers, Diederik van der Feen.

I would also like to thank Chinese PhD students Hongjuan Yu, Rae, Ben (Benhui), Juan, Peng Wang, Peijia, Zhijun, Lei Dong and others in UMCG. Dear Ben and Rae, thank you for always be willing to help me. I will never forget your cooking and our conversations. Best of luck for your future! Dear Juan, you are a hardworking girl. Take care! Dear Peijia, thank you for your help on keeping my luggage in your place.

I would also like to acknowledge Xuefei Cao and your family. Dear Xuefei, thank you very much for giving me the opportunity to study in the UMCG. I enjoyed our conversiosn. I wish you and your family all the best.

Special thanks to Prof. Baofeng Yang, Prof. Zhimin Du, Prof. Hongli Shan, Prof. Yunwei Wei, Prof. Yanjie Lv, Prof. Yong Zhang and others in Harbin Medical University. Thank you for giving me the opportunity and all your support.

To my Paranymphs, speical thanks and appreciation go to you both. Dear Salva, thank you for your friendship and sharing the Indonesian food. Dear Peijia, thank you for your

support.

Finally, I would like to thank my family in China. My wife Ye Yuan, thank you for always supporting me. Thanks for my parents, grandmother, grandfather, brothers, sisters, my wife's family and all my relatives. My heartfelt thanks and appreciation for your love and support. I would also like to thank all my colleagues and friends in China who have supported me along the way.

I wish to thank many other people whose names are not mentioned here but this does not mean that I have forgotten their help. Thank you all!

Weijie

BIOGRAPHY

Weijie Du was born in Neimongol, China. After graduating from high school in 2006, he entered the University via the University Entrance Examination. He moved from Tongliao to Harbin and studied pharmacy in Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, and got a Bachelor of Science degree in 2010. In the same year he entered the graduate school at the Harbin Medical University. In the Department of Pharmacology at the Harbin Medical University, he investigated the novel players involved in cardiovascular diseases and the underlying mechanisms for his Master of Science degree under supervision by Prof. Hongli Shan and Prof. Yanjie Lu. In 2013 under the corporation between Harbin Medical University in China and Groningen University in the Netherlands he was selected as a sandwich PhD candidate. In October, 2013 he moved to Groningen, The Netherlands, to pursue a doctoral degree at the Department of Experimental Cardiology, University Medical Center Groningen. The outcome of his research is presented in this thesis.

